



Title	大腸菌のViable but not culturable cells(VBNC)状態への移行を確認するために用いる培養法の検討( 本文 )
Author(s)	鳥羽, 衛
Citation	
Issue Date	2013-03-21
URL	<a href="http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/1295">http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/1295</a>
Rights	© Author(s)
DOI	
Text Version	ETD

This document is downloaded at: 2023-05-05T00:58:06Z

学 位 論 文

大腸菌の Viable but not culturable cells (VBNC) 状態への移行を

確認するために用いる培養法の検討

福島県立医科大学大学院医学研究科分子病態医科学専攻生体防御学領域感染症学

鳥羽 衛

表題：

大腸菌の Viable but not culturable cells (VBNC) 状態への移行を  
確認するために用いる培養法の検討

所属・著者名：

福島県立医科大学大学院医学研究科分子病態医科学専攻生体防御学領域感染症学

鳥羽 衛

## 概要：

食中毒はウイルス、細菌、化学物質、自然毒など様々な原因により引き起こされる。

このうち細菌性食中毒に関して我が国の現状は、平成 23 年度の厚生労働省（厚労省）の集計で、食中毒発生総数 21,616 名のうち細菌性食中毒と判明した患者数は 10,948 名となっており、死亡者も出ている。細菌性食中毒の対策には、感染源（病因因子）、感染経路（環境因子）、感受性（宿主因子）への対応が求められる。しかし、1996 年、大阪府堺市で発生した O-157 腸管出血性大腸菌食中毒事件のようにその一部が不明確な事例も存在する。この事件では、厚労省から学校給食に供された“かいわれ大根”が原因食材であるとの疑いが発表されたものの、かいわれ大根からは原因菌の検出には至らず、大腸菌の伝播経路が特定できなかった。

大腸菌による食中毒は、この菌を常在細菌として持つ牛の肉に端を発する 경우가多いが、この例のように野菜が感染媒体として疑われるような場合には、感染経路の特定はしばしば難しいものとなっている。その要因として、環境中の細菌数が 1mL あたりにして実際に食中毒を引き起こす菌数と比較して非常に少ないこと、また環境中の細菌が、多くの食中毒原因菌において報告されている「生きているが一般的な培養法により培養できない状態（Viable but not culturable cells ; VBNC）」となっていて検出されにくくなっていることなども可能性として挙げられる。

VBNC に関する報告は 1980 年代からなされており、大腸菌に関しても報告されている。しかし、大腸菌の VBNC 状態への移行に関して、培養できないことを確認する方法に関しては現在まで取り決めがない。多くの先行研究では固形培地（塗布法）によ

る培養を標準法として用いているものの VBNC を誤認識してしまう危険性が指摘されている。そこで、大腸菌の培養に一般的に用いられる方法を比較して、VBNC の確認に用いる最も妥当性のある方法に関して検討するとともに大腸菌の VBNC 状態への移行に関して検討を加えた。

本研究では環境中における大腸菌のモデルとして、低温の純水中に浮遊させた大腸菌を静置保存した試料を用いた。実験はこの試料から一定期間毎にサンプルをとり、細菌培養検査の標準法とされる固形培地に菌を塗抹する方法（塗抹法）、液体培地による方法（液体法）及び菌を固形培地に混釈する方法（混釈法）などを用いて、それぞれの方法で検出された菌数を比較する方法により行った。

大腸菌は経過とともに検出菌数が減少したが、大腸菌標準株（ATCC25922）を 3 週間毎にサンプル採取し培養した実験で、培地に Luria Broth (LB) を用いた培養において塗抹法で 105 日、液体法で 147 日の間大腸菌を検出できた。この塗抹法検出可能期間中のいずれの時点でも液体法は塗抹法より有意に検出菌数が多かった。また、混釈法による検出菌数は塗抹法より有意に多く液体培地と同等であった。この結果から培養可能あるいは不能と判断する方法として液体法、混釈法が有効であった。しかし、液体培地では複数の菌を分別して検出することができないことから、大腸菌の VBNC の確認には混釈法が最も有用であると考えられた。

この結果を踏まえ、混釈法を用いた VBNC 検出実験として、VBNC 状態にある細菌を検出するとされるピルビン酸添加培地である R2A agar 培地と通常培地である LB agar

培地により大腸菌の検出状況を検討した結果、両培地間に差はなかった。また、混釈法による大腸菌検出限界時点においても電子顕微鏡による観察で、菌の矮小化、円形化などの形態的変化を観察することはできなかった。

本研究において大腸菌の VBNC 状態への移行は確認されなかった。少なくとも混釈法による培養可能期間中に観察される大腸菌の菌数減少は、大腸菌が次第に死菌となっていた結果である可能性が示唆された。今後、混釈法により培養できないと判定した大腸菌を感受性動物に摂食させる感染実験などを通して詳細を明らかにしたい。



## 【序論】

食中毒はウイルス、細菌、化学物質、自然毒など様々な要因により引き起こされるが、このうち細菌性食中毒に関して我が国の現状は、平成 23 年度の厚生労働省の集計（食中毒発生総数 21,616 名、うち細菌性食中毒と判明した患者数 10,948 名）によるとサルモネラ属菌によるものが 3,068 名（67 件）、カンピロバクター・ジェジュニ/コリが 2,341 名（336 件）、ウェルシュ菌が 2,784 名（24 件）、腸管出血性大腸菌が 714 名（25 件）、その他の病原性大腸菌が 967 名（24 件）などとなっており、サルモネラ属菌で 3 名、腸管出血性大腸菌で 7 名の死者を出している<sup>1)</sup>。

細菌性食中毒の対策には、感染源（病因因子）、感染経路（環境因子）、感受性（宿主因子）への対応が求められる。しかし、1996 年、大阪府堺市で発生した 0-157 腸管出血性大腸菌食中毒事件のようにその一部が不明確な事例も存在する。この事件では、厚生労働省（厚労省）から学校給食に供された“かいわれ大根”が原因食材であるとの疑いが発表されたものの、かいわれ大根からは原因菌の検出には至らず、大腸菌の伝播経路が特定できなかった。事件は、新たな患者の発生がなくなったことにより収束することとなったが、同様の事件の発生を予防するという観点では不十分な対応となった。

感染経路の特定が難しい要因として、環境中の細菌数が 1mL あたりにして実際に食中毒を引き起こす菌数と比較して非常に少ないことが挙げられるが、それと共に食中毒原因菌の中には生きているが一般的な培養方法では培養できない状態 [Viable but not culturable (cells) ; VBNC] になっているものが存在し、検出を難しくしてい



ることも考えられる。

VBNC は 1980 年代からサルモネラ・エンテリティディス<sup>2)</sup>、ビブリオ・ブルニフィカス<sup>3)4)</sup>、ビブリオ・コレラ<sup>5)</sup>、カンピロバクター・ジェジュニ<sup>6)</sup>などで報告され、大腸菌に関しても報告されている<sup>7)</sup>。しかし、大腸菌の VBNC 状態への移行に関して、培養できないことを確認する方法に関しては現在まで取り決めがなく、固形培地（塗布法）による培養を標準法として用いているものの VBNC を誤認識してしまう危険性が指摘されている<sup>8)</sup>。そこで現在、大腸菌の培養に関して一般的とされる方法として数種類が使用されている中、より大腸菌を検出できる方法を検討し、その方法による VBNC の確認が必要である。本研究では、大腸菌の培養に用いられる方法を比較して、VBNC の確認に用いる最も妥当性のある方法を検討するとともに大腸菌の VBNC 状態への移行に関して検討を加えた。

## 【方法】

### 1. 大腸菌株

実験には、大腸菌標準株 1 株 (ATCC25922) と福島県立医科大学附属病院で分離された大腸菌 2 株 (臨床分離株 1、臨床分離株 2) を用いた。臨床分離株は、臨床検査のために提出された検体から分離され、同院検査部にて大腸菌と同定された菌株で、16S rRNA 遺伝子の塩基配列より大腸菌であることを再確認したものである。

### 2. 使用培地

#### 1) 液体培地

##### ①Luria Broth (LB) 液体培地

Bacto Trypton (Difco) 10 g、Yeast Extract (Difco) 5 g、NaCl 10 g を deionized water (DW) に溶解し、NaOH で pH を 7.5 に調整した後 1 ℓとし、作成した培地をオートクレーブにて滅菌した。

##### ②Super Broth (SB) 液体培地

Bacto Trypton (Difco) 25 g、Yeast Extract (Difco) 15 g、NaCl 5 g を DW に溶解し、NaOH で pH を 7.5 に調整した後 1 ℓとし、作成した培地をオートクレーブにて滅菌した。

## 2) 固形培地

### ①普通寒天培地、デスオキシコーレイト培地 (DC)、R2A agar 培地

普通寒天培地 (日水)、デスオキシコーレイト培地 (栄研)、R2A agar 培地 (Difco)

は規定量を DW 1 ℓ に懸濁後、オートクレーブにて滅菌し、シャーレに 20 ml ずつ分注して固化させた。

### ②LB agar 培地、SB agar 培地

LB または SB 液体培地 1 ℓ あたり 15 g の Agar (Difco) を加えた液をオートクレーブにて滅菌し、シャーレに分注して固化させた。

### ③Petrifilm™ 培地

Petrifilm™ 培地 (3M) は Aerobic Count Plate (AC; 好気性細菌数測定用) と Coliform Count Plate (CC; 大腸菌群数測定用) を用いた。

## 3. 菌液の調整

血液寒天培地 (トリプチケースソイ II 5% ヒツジ血液寒天培地、BD) 上に発育したコロニーから 1 白金耳分の菌を釣菌し、LB 液体培地 2 mL に懸濁して 37 °C、24 時間振盪培養した。この菌液から 40  $\mu$ l をとり新しい LB 液体培地 4 ml に加え、37 °C にて 3 時間振盪培養により対数増殖期にある菌を 3000 rpm、10 分間遠心して pellet とした。

この菌を DW 4 ml に再懸濁、遠心して洗浄後、再度 DW 4 ml に懸濁した。この懸濁液を測定波長 550 nm による光学濃度 (OD) が 0.15 になるまで DW にて希釈 (マクファーランド濁度標準液番号 1 相当) し、この希釈液を更に DW で 1/10 に希釈して大腸菌の浮遊液 (菌数:  $3 \times 10^7$  cfu/ml) を作成した。調整した菌液は、これ以降何も添加せずに飢餓状態として 4 °C 及び 20 °C に静置保存した。保存した菌液から 1 週間毎あるいは 3 週間毎にサンプルを採取して菌数を測定した。

なお、本報では、これ以降、この条件で作成し、保存した菌液を「飢餓状態」と表記する。

#### 4. 大腸菌の定量培養

定量培養は液体培地、固形培地とも 6 回行い、1 実験に 2 ないし 3 枚の培地またはプレートを用いて菌数を得た。

##### 1) 液体培地

各 well に 100  $\mu$ l の液体培地を入れた 96 well プレートに、DW で 10 倍段階希釈した菌液の検体を 1 well あたり 10  $\mu$ l ずつ 5 well に接種した。37 °C で 24 時間培養後、菌が発育し、混濁した well 数を測定した。全 well 中、菌の増殖が認められた well 数を最確数表に当てはめて菌数を推定した [Most probable number (MPN) 法]<sup>9)</sup>。

MPN 法による推定値は 1 ml あたりに換算して菌数 (cfu/ml) とした。

## 2) 固形培地

### ①塗抹法

菌液を必要に応じてDWにて10倍階段希釈系列を作成し、その $50\mu\text{l}$ を固形培地に滴下、コンラージ棒で展延後、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ で24～72時間培養した。出現したコロニー数を計測後、その数値を20倍して菌数(cfu/ml)とした。

### ②混釈法

菌を必要に応じてDWにて10倍階段希釈系列を作成し、その1 mlを新しいシャーレに滴下した。そこに加熱溶解して $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて保温した寒天培地を10 ml加え、菌液と培地をシャーレ内でよく混和した。均一となったら培地が固化するまで静置し、その上から液状の寒天培地10 mlを重層して再度静置固化させた後、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ で24～72時間培養して発育したコロニー数を計測して菌数(cfu/ml)とした。

### ③Petrifilm法

必要によりDWにて10倍階段希釈した菌液1 mlをPetrifilmの培地部分に接種し、上からプラスチックフィルムで覆った後、ACは48時間、CCは24時間、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて培養した。培養後、発育したコロニー数を計測して菌数(cfu/ml)とした。

## 5. 統計解析

測定された菌数は正規性の検定、F 検定による両群間の分散の同等性を検証し、正規性、分散の同等性が確認された場合はスチューデントの  $t$  検定、正規性の確認後、分散の同等性が確認されなかった場合はウェルチの  $t$  検定により比較検討した。

## 6. 大腸菌の VBNC 状態への移行に関する検討

### 1) R2A agar 培地を用いた検討

飢餓状態における経過期間が長期となった大腸菌を用いて、R2A agar 培地（混釈法）と LB agar 培地（混釈法）により菌数を測定し、両培地間の菌検出状況を比較した。また、試料の適格性を確認するため LB 液体培地によっても菌数を測定した。

### 2) 形態的な検討

走査電子顕微鏡（日本電子 JMS - 5800）にて 6 KV 高真空モードで菌の形態を観察した。

## 【結果】

### 1. 大腸菌の飢餓状態経過期間と検出菌数に関する検討

飢餓状態とした大腸菌標準株、臨床分離株 1、臨床分離株 2 を普通寒天培地（塗抹法）により 1 週間毎に定量した結果、経過期間に応じ検出菌数が減少した。大腸菌が検出不可能になるまでの日数には菌株により差を認めたが、対数増殖期にあった細菌を DW に懸濁し、検出不能になるまでの日数は最も短期間の菌でも 100 日あまりを要し、大腸菌が長期の飢餓状態に耐え得ることが観察された。それぞれの菌株において 4℃保存の方が 20℃保存と比較して早期に検出不能となり、また 3 菌株において 4℃保存でも 20℃保存でも検出不能となるまでに要する日数の順序は変わらず、大腸菌標準株、臨床分離株 2、臨床分離株 1 の順であった（図 1）。

### 2. 培地の種類と検出菌数の検討

LB 液体培地、SB 液体培地とそれぞれに Agar を加えた固形培地及び Petrifilm (AC、CC) を大腸菌検出培地として使用し、大腸菌標準株を用いて検出状況を比較した。塗抹法により菌を接種した固形培地での定量と液体培地での定量では、LB、SB 培地とも液体培地の検出菌数が有意差をもって多かった（表 1）。また、菌の検出期間も塗抹法で 105 日、液体法で 147 日と液体法が長期に渡って検出可能であった（図 2）。この検出の差は保存 0 日の時点で既に現れ、実験経過中のいずれの時点でも同じ傾向であった（図 2）。

一方、標準培地となっている LB 培地、栄養分が豊富に添加された SB 培地の栄養分の添加状態が異なる培地間における比較では、検出菌数の差は認められなかった。

Petrifilm 培地は、固形培地でありながら LB、SB 液体培地と同レベルの検出菌数を認めたが、検出期間は AC、CC とも 126 日であり、液体培地での検出期間が長かった（図 2）。

以上の結果をまとめると、①培地が液体であることが固形であることより菌の検出が良い ②菌を接種後、培地の表面をプラスチックフィルムで覆う Petrifilm は固形培地でありながら液体培地と同じレベルで菌が検出できることがわかった。

### 3. 培地への菌接種方法の検討

複数の培地を使用して細菌を定量した結果から菌検出の状況が固形培地と液体培地や Petrifilm で大きく異なる原因が、菌表面全体が水分、培地でおおわれているか否かによるのではないかと考えられた。そこで固形培地を寒天が固まる前に菌液に混ぜ、さらに培地を重層して菌を培地で包み込む混釈法と今までの塗抹法での培養を比較検討した。

飢餓状態での静置 0 日、42 日の大腸菌標準株試料を LB Agar 培地、DC 培地を使用して、塗抹法及び混釈法により菌数 (cfu/mL) を測定した。LB agar 培地（塗抹法）による検出菌数は 0 日： $1.6 \times 10^6 \pm 1.9$ 、42 日： $5.1 \times 10^2 \pm 3.2$ 、LB agar 培地（混釈法）は 0 日： $5.4 \times 10^7 \pm 1.3$ 、42 日： $7.6 \times 10^3 \pm 1.5$  であった。また、DC 培地（塗抹



法) では、0 日 :  $4.3 \times 10^5 \pm 3.1$ 、42 日 :  $4.0 \times 10^2 \pm 2.8$ 、DC 培地 (混釈法) は 0 日 :  $3.3 \times 10^6 \pm 1.2$ 、42 日 :  $8.2 \times 10^2 \pm 2.6$  であった。0 日、42 日の試料とも、また LB Agar 培地、DC 培地とも混釈法の方が塗抹法より検出菌数が多く、0 日における LB Agar 培地、DC 培地及び 42 日における LB Agar 培地では、両群の検出菌数をスチューデントの t 検定で検証した結果、有意差が得られた ( $p < 0.01$ ) (図 3)。また、LB Agar 混釈法と LB 液体培地の比較では、LB 液体培地における検出は 0 日 :  $3.9 \times 10^7 \pm 2.4$ 、42 日 :  $1.3 \times 10^4 \pm 1.2$  であり、0 日、42 日の試料とも両群の検出菌数をウェルチの t 検定で検証した結果、有意差を認めなかった ( $p < 0.01$ ) (図 4)。

以上の結果より、培養可能細菌を多く検出するのに有効であるのは菌体全体が培地でおおわれていることであり、Petrifilm はプラスチックフィルムで固形培地表面を覆うことによってこの条件を達成していることが明らかとなった。

#### 4. 大腸菌の VBNC 状態への移行に関する検討

飢餓状態での 4 °C 静置 147 日、168 日、189 日の大腸菌標準株試料を R2A agar 培地 (混釈法)、LB Agar 培地 (混釈法)、LB 液体培地により菌数を測定した結果、R2A agar 培地と LB agar 培地では菌が検出されたが、LB 液体培地では 3 時点のどの時点においても大腸菌は検出されなかった。また、R2A agar 培地と LB agar 培地の両群間で検出菌数に有意差はなかったが、むしろ LB agar 培地の検出が勝る傾向であった (表 3)。

大腸菌液の調整過程において LB 液体培地中で対数増殖期にある大腸菌 (対数増殖

期)、遠心分離して LB 液体培地を DW に置換した直後の大腸菌 (飢餓状態 0 日)、調整後 4 °C 静置 84 日の大腸菌 (飢餓状態 84 日)、調整後 4 °C 静置 168 日 (飢餓状態 168 日) の大腸菌を走査電子顕微鏡により形態を観察し比較した。標準株の電顕写真による形態比較では、10,000 倍での観察において飢餓 168 日大腸菌から鞭毛の減少、表面が粗くなっている様子が観察されたが、矮小化、円形化は認めなかった。また、各時点において形態の異なる大腸菌の混在は認められなかった (図 5)。

## 【考察】

腸管出血性大腸菌のアウトブレイクは国内外を問わず何度も発生してきた。その多くはこの菌を常在細菌として持つ牛肉に端を発するものであるが、1996年の堺市の学校給食が原因となった事例や2011年ヨーロッパで起こった事例<sup>10)</sup>のように野菜が原因と考えられるアウトブレイクも存在する。大腸菌は哺乳動物の腸内を主な生息場所とする菌で、本来、環境中で増殖する菌ではないことを考えると、野菜が原因となるルートとして最も考えやすいのは畑に散布する水が牛の糞に汚染され、菌が野菜に付着することであろう。しかし、この経路が証明された感染事例はなく、河川の水に存在する腸管出血性大腸菌数も明らかではない。しかし、感染事例とは関係なくレタスや河川から大腸菌が検出された報告はなされている<sup>11) 12)</sup>ことからこの経路の可能性は十分に考えられ、リスクファクターとして認識しておく必要がある。これらの研究における大腸菌の検出は、ベロ毒素あるいは特有遺伝子を標識して大腸菌の存在を証明している。環境中に存在する大腸菌が、実際に問題となり得るのかを検討する上で、検出された大腸菌がVBNCとして存在するのか、あるいは単に菌数が少ないために検出されないのか、またVBNCとして存在する大腸菌が増殖可能な状態に復帰することがあるのかは重要な検討課題である。本研究はこういった課題を解明する第1歩として、VBNCの判定に用いる大腸菌の検出法を検討するため、水に懸濁した大腸菌を低温で保存したうえで、様々な培養法により菌の定量を行った。

培地に添加する栄養に関して、2-3倍の栄養分の差があるLB培地とSB培地間に検

出期間、検出菌数の差はなかった。これは、栄養に関しては、多ければ多いほど検出菌数が増えるわけではなく、一定以上の栄養があればそれ以上に栄養を培地に添加する必要はないことを示しているが、大腸菌のあまり高くない栄養要求性がその要因と考えられた。

固形培地と液体培地の比較では、Agar 含有の有無以外は同じ成分で作成した培地により菌を培養したが、塗抹法により培地に菌を接種した場合、LB Agar 培地と LB 培地、SB Agar 培地と SB 培地の比較では、Agar を含まない液体培地の検出菌数が多く、菌検出における液体培地の優位性が示された。寒天含量が異なる培地を用いた VBNC 状態への移行を検討する研究として、ビブリオ・ブルニフィカスに関して、寒天含有量を減らし、柔らかく作成した培地では通常の培地より細菌の検出が 1.1~8 倍多い菌数が検出されたとする報告があり<sup>13)</sup>、今回の大腸菌を用いた研究でも同様の結果が得られたと考えられる。

この結果からは細菌の増殖に対して Agar が悪影響を与えている可能性も考えられたが、Petrifilm は Agar を含有しているにもかかわらず検出菌数は液体培地と同レベルであった。さらに Agar を含有する LB Agar 培地への接種方法を塗抹法から混釈法に変更したところ、混釈法では液体培地と同等の菌検出が得られた。この結果から大腸菌検出にあたって問題となるのは Agar 含有の有無ではなく、菌を培養している間の条件、すなわち菌と培地の接触であると考えられた。固形培地に塗抹法で菌を接種した場合には増殖した菌は盛り上がり、上部に持ち上げられた菌は培地との接触を

失い、また乾燥にさらされることになるが、これが菌の損傷等の誘因となり検出を低下させる要因と考えられた。

大腸菌の検出に関する実験の結果からは液体培地あるいは混釈法による検出が良好な成績であったが、そもそも液体培地では複数の菌を分別して検出することができず、それにより固形培地が開発された経緯がある。今回の結果から、VBNC 状態の確認には、菌数が少ない状況においても増殖可能な細菌を検出できた混釈法による培養が、有用であると考えられた。

食中毒原因菌のVBNC状態への移行に関しては、現在までに例えばサルモネラ菌属に関してはVBNC状態への移行と特定遺伝子発現量の関係、病原性の保持などの報告がなされ<sup>14) 15)</sup>、その他の多くの細菌においてもその実態が明らかにされつつある<sup>16)-19)</sup>。

それに対して、大腸菌のVBNC状態への移行は遺伝子的な検討報告はある<sup>20) 21)</sup>が、VBNCであることを確認する大腸菌の検出に標準法として塗抹法が用いられているなど、今回の結果を考えるとまだ十分には解明されているとはいえない。VBNCの定義化もなされ<sup>22)</sup>、VBNCは培養不能とされてから単に栄養付加により培養可能となったものとは明確に区別されている。今回の実験では100日を超えた経過観察期間があり、その期間の間検出され続けた、即ちVBNC状態への移行に係る遺伝子を発現させないまま経過してきた菌株が、新たな機能獲得によりVBNCに移行したとは考え難い。大腸菌がVBNC状態になるとしても更なる機序の解明が必要である。

また、VBNC状態となった細菌を培養可能とする方法としてピルビン酸の添加が報告

されている<sup>23)</sup>が、今回、このピルビン酸を含有するR2A agar培地<sup>24)</sup>と通常培地であるLB agar培地により同じ大腸菌試料を培養して測定される菌数の比較を行った。R2A agar培地は、塩素消毒された飲料水を培養した研究で、標準培地より2.3~9.86倍菌を検出できたとする報告があり<sup>25)</sup>、培養試料中に損傷により培養不能となった菌が含まれていた場合も含めて、両培地間に菌数の差を認めることが想定されたが、両群間に差は認められなかった。このことは、対象試料中にVBNC状態となった菌あるいは損傷した菌が存在することに否定的な結果である。また、電顕による観察からも細菌が環境ストレスにさらされた時、自己の生存を図るために行う矮小化、球形化或いはその他の形態的变化と未変化体の混在は、培養可能な期間において認められなかった。

本研究においてVBNCとなった大腸菌は確認できなかった。大腸菌がVBNC状態となるか否かに関してコンセンサスを得るにはなお多くの研究が必要であるが、少なくとも大腸菌のVBNC状態への移行は、現在の標準法である塗抹法より優れる混釈法により確認されるべきであり、混釈法による培養可能期間中に観察される大腸菌の菌数減少は、大腸菌がVBNC状態となっていた結果というより次第に死菌となっていた結果である可能性が示唆された。今後、混釈法により培養できないと判定した大腸菌を感受性動物に摂食させる感染実験などを通して詳細を明らかにしたい。

**【謝辞】**

本研究をまとめるにあたり、ご指導を頂きました指導教員の錫谷達夫教授に感謝致します。また、研究の遂行にあたって多くの示唆やご協力を頂きました微生物学講座の皆様感謝致します。

## 【引用文献】

- 1) 「食中毒統計資料」(厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課食中毒被害情報管理室), <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>, アクセス日時:2013.01.14
- 2) Roszac D.B., Grimes D.J., Colwell R.R., Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems, Can. J. Microbiol. (1984) 30:334-338.
- 3) Oliver J.D., Wanucha D., Survival of *Vibrio vulnificus* at reduced temperatures and elevated nutrient, J. Food Saf. (1989) 10:79-86.
- 4) Linder K., Oliver J.D., Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus*, Appl. Environ. Microbiol. (1989) 55:2837-2842.
- 5) Xu H.S., Roberts N., Singleton F.L., Attwell R.W., Grimes D.J., Colwell R.R. Survival and Viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* in the estuarine and marine environment, Microb. Ecol. (1982) 8:313-323.
- 6) Rollins D.M., Colwell R.R., Viable but non-culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment, Appl. Environ. Microbiol. (1986) 52:531-538.



- 7) Flint K.P., The long-term survival of *Escherichia coli* in river water, J. Appl. Bacteriol. (1987) 63:261-270.
- 8) van Frankenhuyzen J.K., Trevors J.T., Lee H., Flemming C.A., Habash M.B., Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration, Appl Environ Microbiol. (2011) 87:263-272.
- 9) 森地敏樹, 食品微生物検査マニュアル, 改訂第2版、柳沼健史, 山口重人, 石塚巖, 遠藤明彦, 栄研化学, 東京 (2009) 64-66.
- 10) Aurass P., Prager R., Flieger A., EHEC/EAEC 0104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief, Environ Microbiol. (2011) 13:3139-3148.
- 11) Dinu L.D., Bach S., Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* 0157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor, Appl Environ Microbiol. (2011) 77:8295-8302.
- 12) Liu Y., Wang C., Fung C., Li X.F., Quantification of viable but nonculturable *Escherichia coli* 0157:H7 by targeting the rpoS mRNA, Anal Chem. (2010) 82:2612-2615.
- 13) Weichert D., Kjelleberg S., Stress resistance and recovery potential of

culturable and viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*, Microbiology. (1996)142:845–853.

14)Kusumoto A., Asakura H., Kawamoto K., General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*, Microbiol Immunol. (2012)56:228–237.

15)Passerat J., Got P., Dukan S., Monfort P., Respective roles of culturable and viable-but-nonculturable cells in the heterogeneity of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasiveness, Appl environ Microbiol. (2009)75:5179–5185.

16)Smith B., Oliver J.D., In situ and in vitro gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state, Appl. Environ Microbiol. (2006)72:1445–1451.

17)Baffone W., Casaroli A., Citterio B., Pierfelici L., Campana R., Vittoria E., Guaglianone E., Donelli G., *Campyrobacter jejuni* loss of culturablility in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model, Int. J. Food Microbiol. (2006)107:83–91.

18)Mishra A., Taneja N., Sharma M., Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholera* 01 in freshwater microcosm, J.

Appl Microbiol. (2012) 112:945–953.

19) Senoh M., Ghosh B. J., Ramamurthy T., Colwell R. R., Miyoshi S., Nair G. B., Takeda Y., Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells, Microbiol Immunol. (2012) 56:342–345.

20) Boaretti M., Lleo M. M., Bonato B., Signoretto C., Canepari P., Involvement of rpoS in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state, Environ Microbiol. (2003) 5:986–996.

21) Pinto D., Almeida V., Almeida S. M., Chambel L., Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli, J. Appl Microbiol. (2011) 110:1601–1611.

22) Whitesides M. D., Oliver J. D., Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state, Appl Environ Microbiol. (1997) 63:1002–1005.

23) Wai S. N., Mizunoe Y., Takade A., Yoshida S., A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila*, Arch Microbiol. (2000) 173:307–310.

24) Pyle B. H., Broadaway S. C., McFeters G. A., A rapid direct method for enumerating respiring enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water,

Appl Environ Microbiol. (1995) 61:2614-2619.

25) Reasoner D. J., Blannon J. C., Geldreich E. E., Barnick J.,

Nonphotosynthetic pigmented bacteria in a potable water treatment and distribution system, Appl Environ Microbiol. (1989) 55:912-921.

## 図のタイトルおよび説明

### 図 1. 大腸菌液作成後の経過期間と検出菌数の関係

大腸菌標準株 1 株、臨床分離株 2 株を培養至適条件下に対数増殖している状態から飢餓状態に移行させ、4℃及び 20℃に保存して普通寒天培地（塗抹法）により経時的に菌数を測定した。経過期間の長期化と共に検出菌数が減少したが、4℃保存の菌は 20℃保存の菌に比較して検出可能期間が短かった。また、菌株により検出可能期間は異なったが、最も短期間の菌株であっても 4℃保存において 100 日を超えた。

### 図 2. 培地の種類と検出菌数の関係

4℃に静置保存した大腸菌標準株を 3 週間毎にサンプル採取して固形培地 4 種類 (LB Agar、SB Agar、Petrifilm™ : AC 及び CC)、液体培地 2 種類 (LB、SB) に接種して菌数を測定した (LB Agar、SB Agar への菌接種は塗抹法による)。液体培地 (LB、SB) により検出される菌数は対応する固形培地 (LB Agar、SB Agar) と比較して経過期間中のいずれの時点でも多く、また検出可能期間も長期間に及んだ。また、Petrifilm は Agar を含有する培地であるが、検出菌数は液体培地 (LB、SB) と同レベルであった。

### 図 3. 塗抹法と混釈法の比較

固形培地 (LB agar、DC) への菌の接種方法として塗抹法と混釈法を用い、大腸菌標準株試料作成 0 日と 42 日時点において検出される菌数を測定した。混釈法は塗抹法と比較して検出される菌数が多かった。

### 図 4. 固形培地 (混釈法) と液体培地の比較

LB agar (混釈法) と LB 液体培地を用い、大腸菌標準株試料作成 0 日と 42 日時点において菌数を測定し、検出される菌数を比較した。塗抹法では液体培地に検出菌数で劣った固形培地であったが、混釈法においては同等の検出菌数が得られた。

### 図 5. 大腸菌の飢餓状態経過期間による形態の変化

大腸菌液の調整過程において、①LB 液体培地中で対数増殖期にある大腸菌 (対数増殖期) ②遠心分離して LB 液体培地を DW に置換した直後の大腸菌 (飢餓状態 0 日) ③調整後 4 °C 静置 84 日の大腸菌 (飢餓状態 84 日) ④調整後 4 °C 静置 168 日 (飢餓状態 168 日) の大腸菌 を走査電子顕微鏡 (日本電子 JMS - 5800) にて 6 KV 高真空モードで観察して形態を比較した。大腸菌標準株の観察においては、168 日間経過した大腸菌において鞭毛の減少、表面が荒れた状態を認めたものの各時点において矮小化、円形化などの異なる形態の大腸菌の混在は認めなかった。

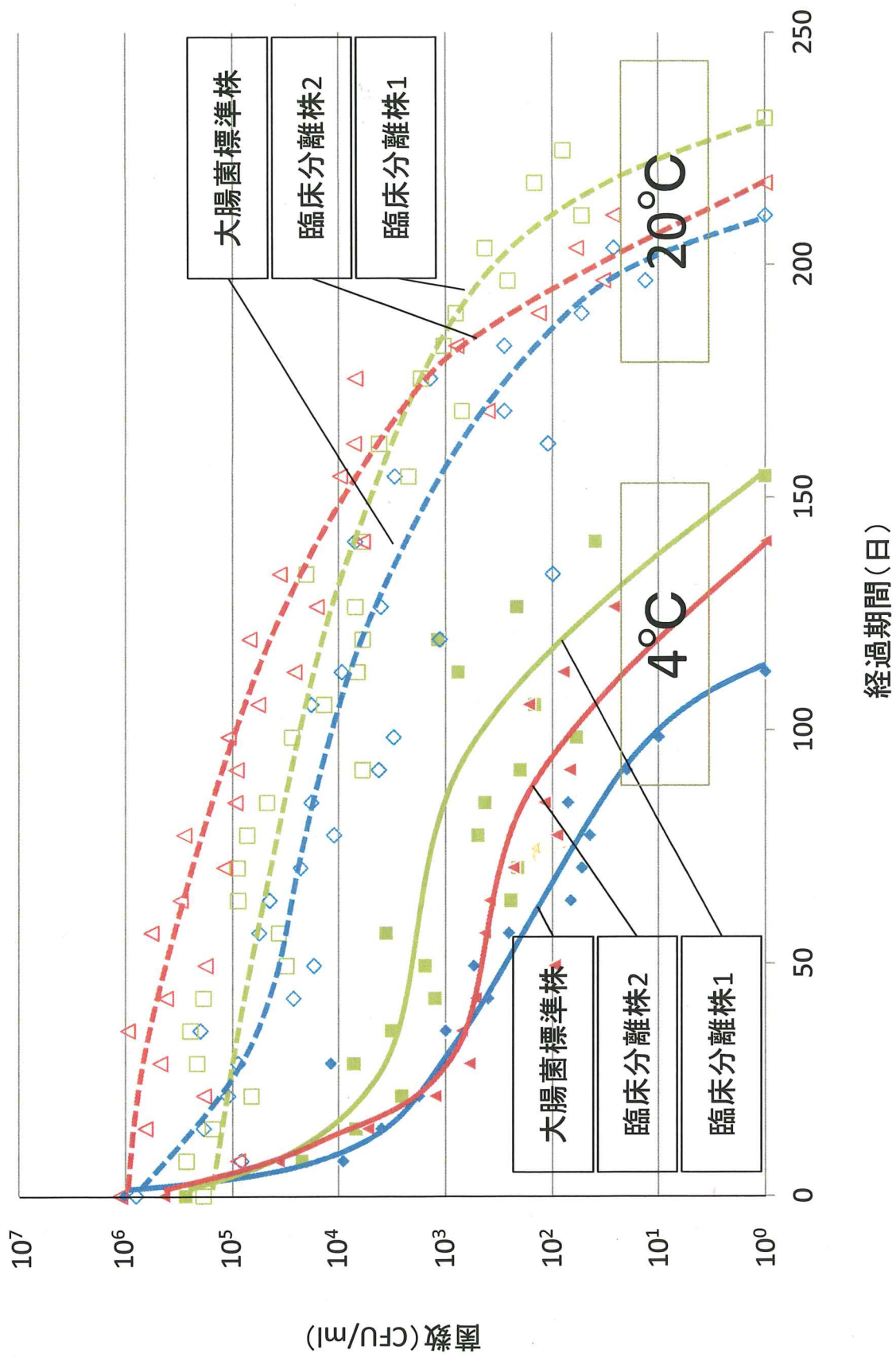


図1

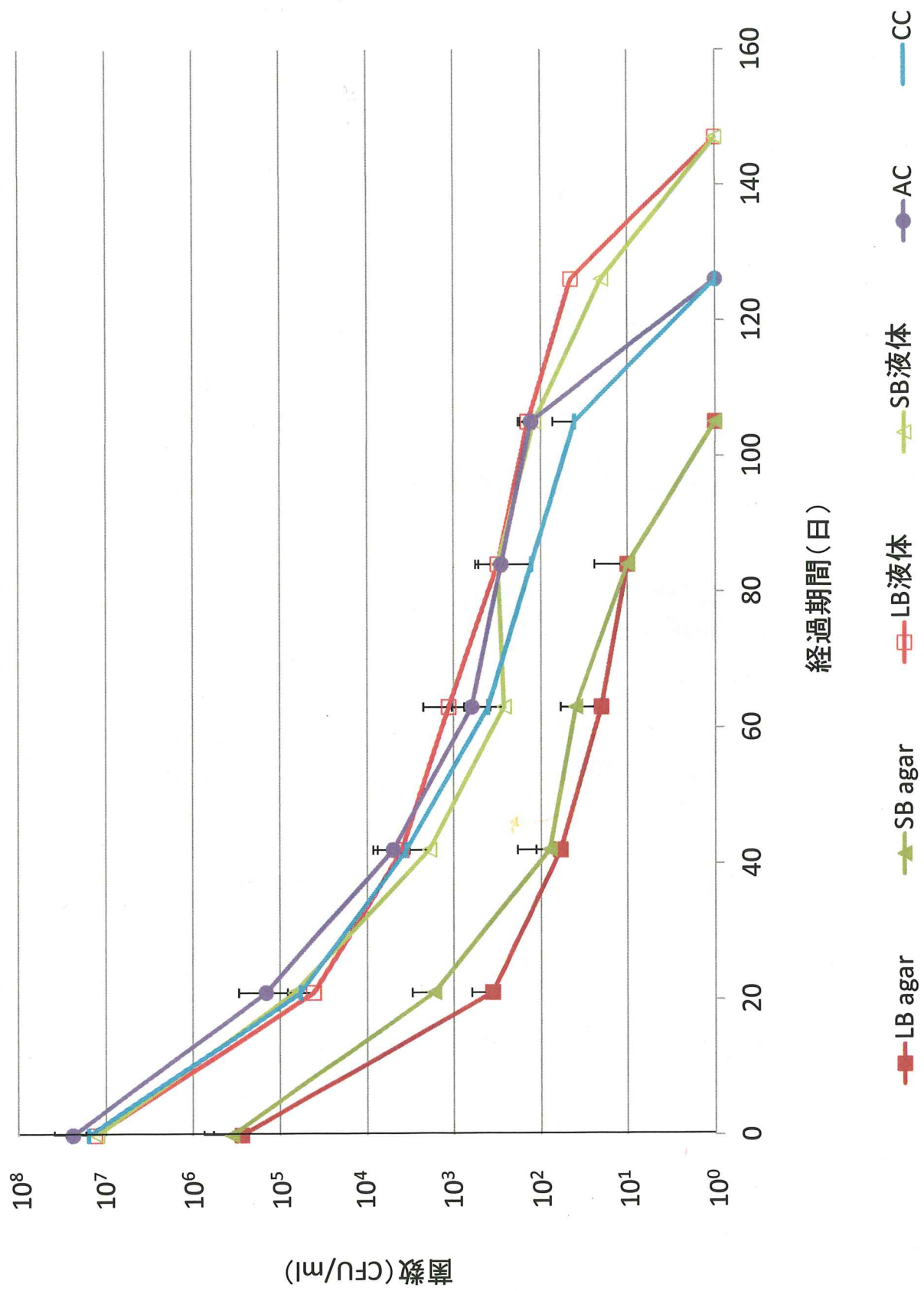


図2



※※※ $p < 0.01$   $n=6$

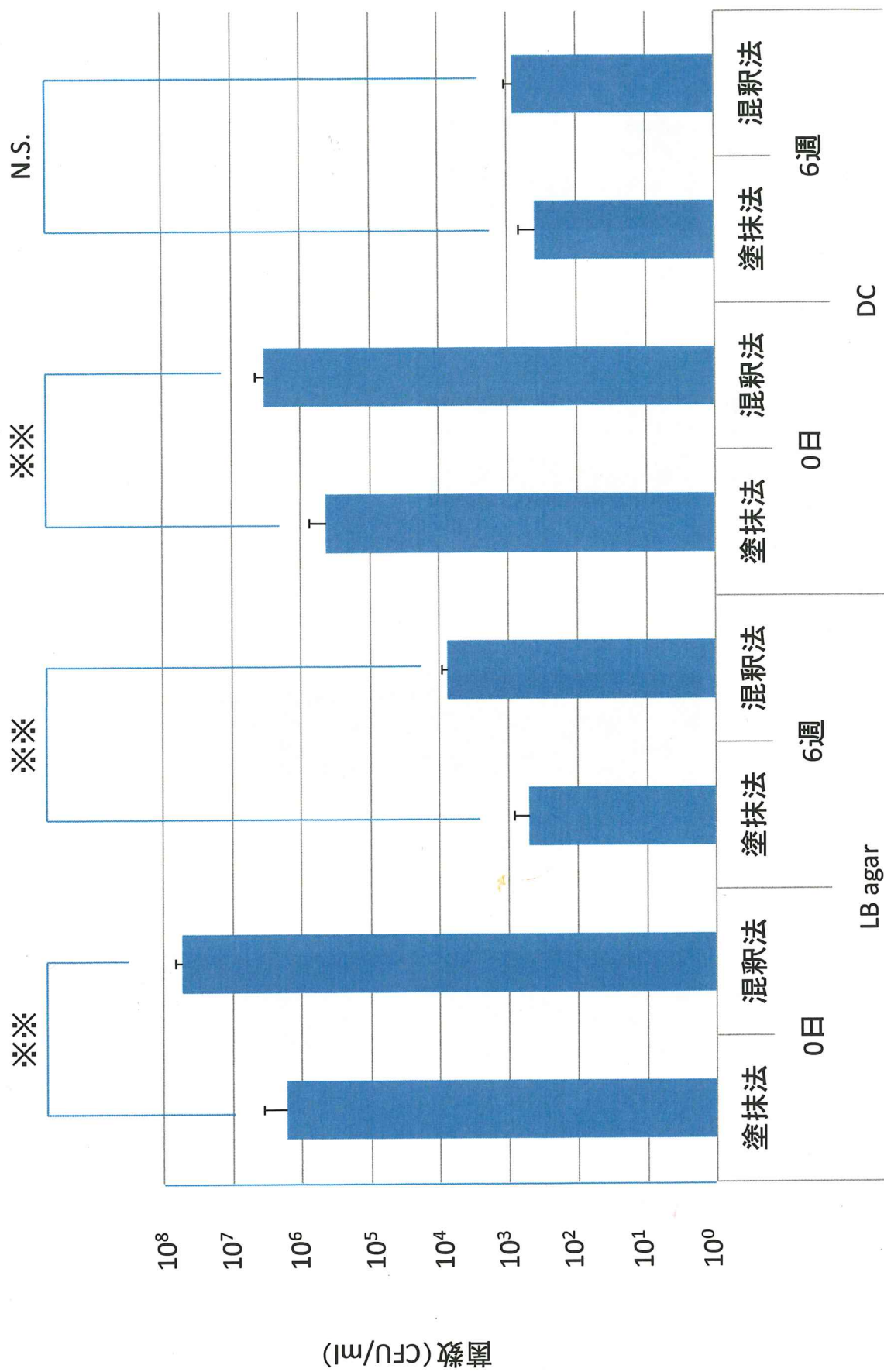


図3

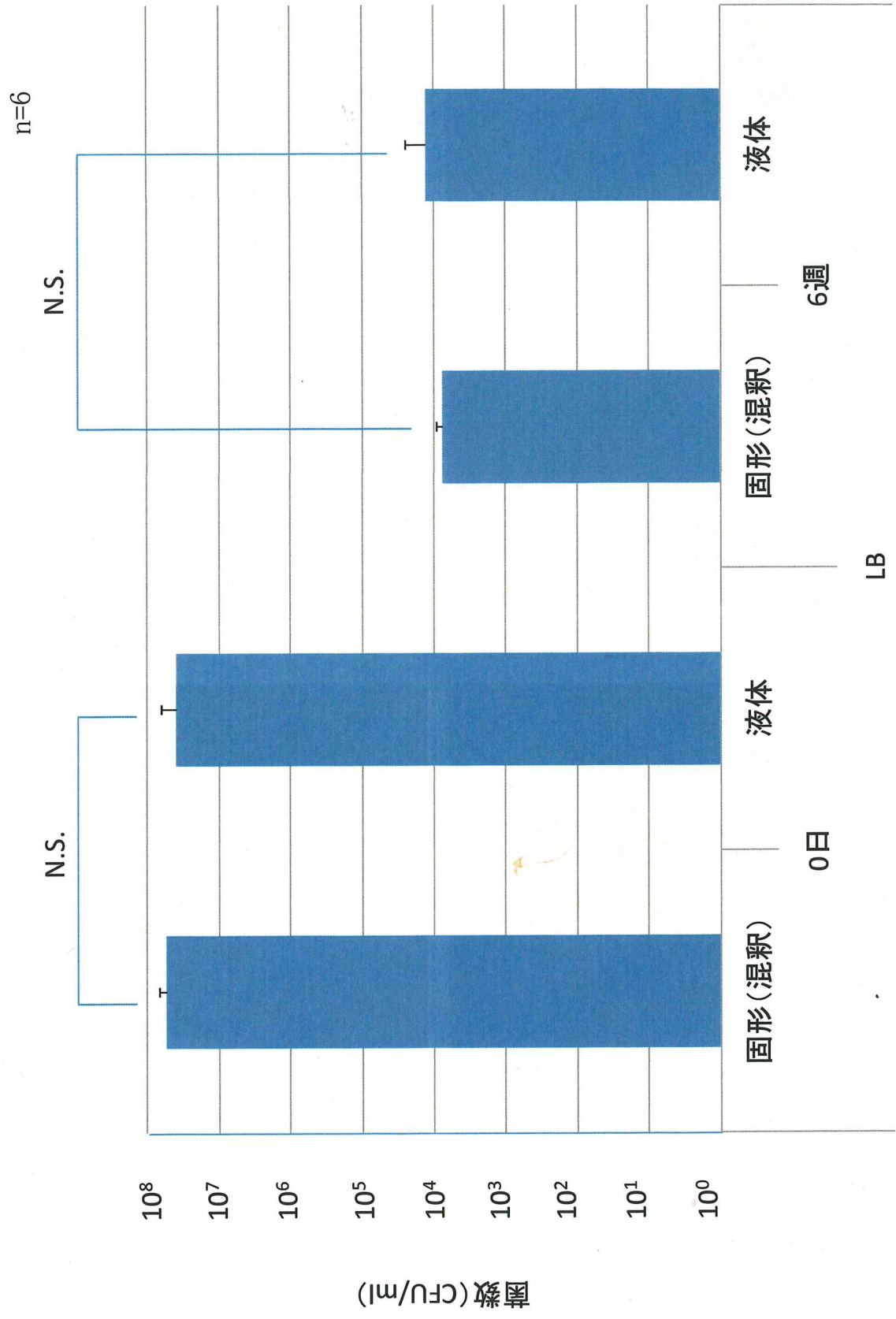
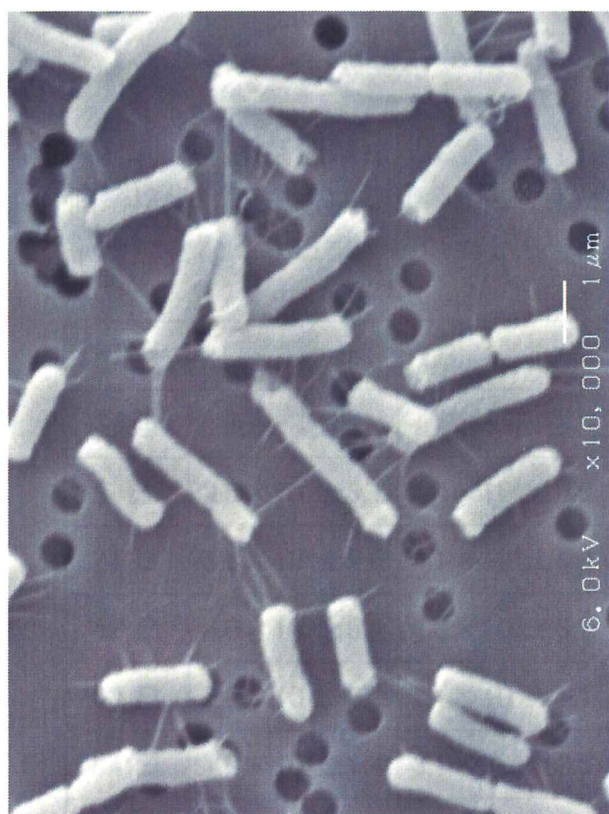
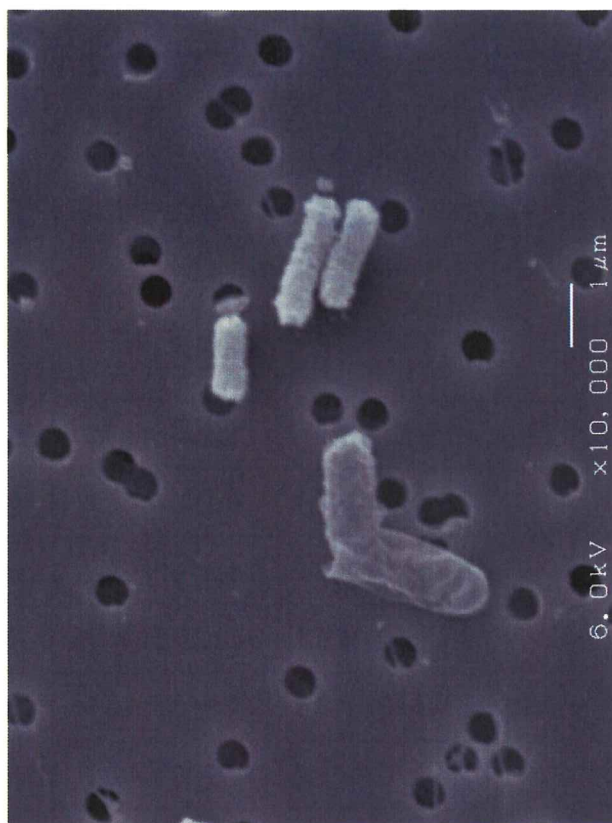


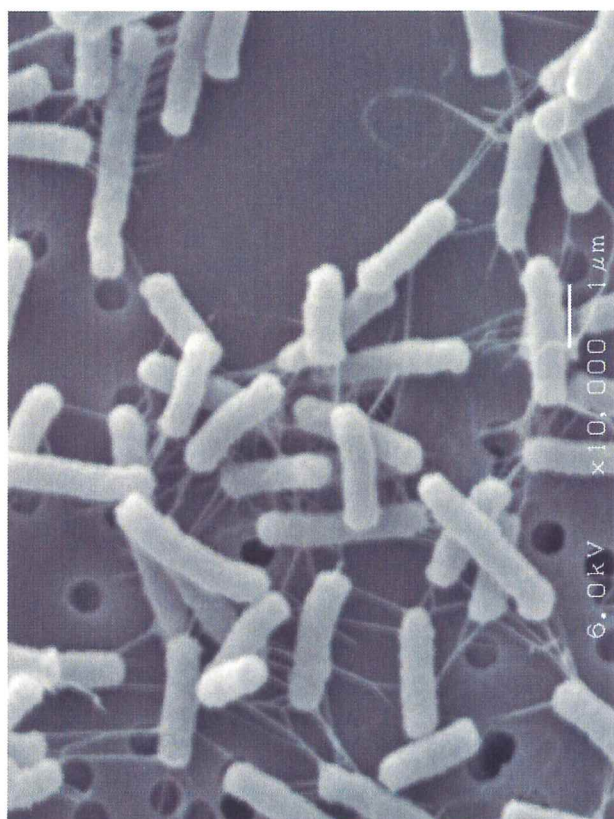
図4



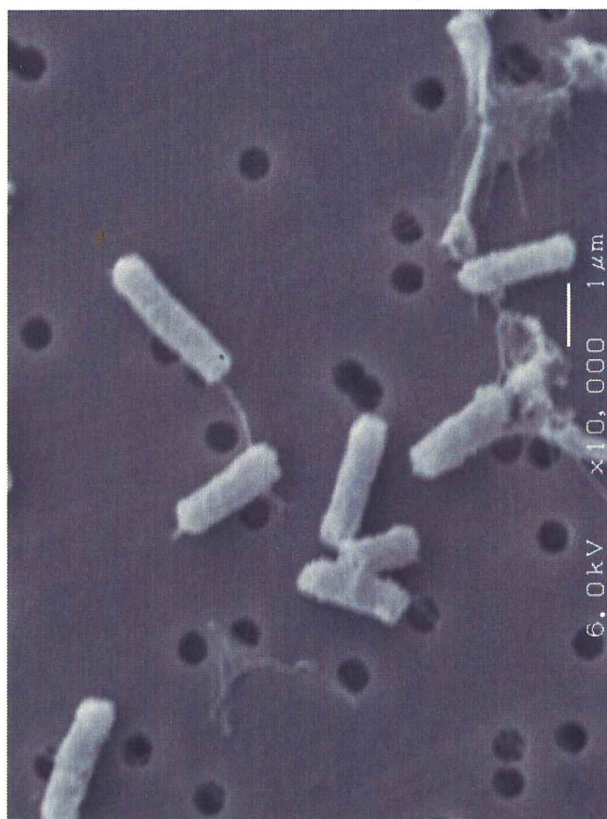
飢餓状態 0 日



飢餓状態 168 日



対数増殖期



飢餓状態 84 日



表 1. 大腸菌の検出菌数 (cfu/ml) と培地形態の関係

試料 (大腸菌標準株) に含まれる菌の定量において、検出菌数は液体培地が固形培地 (塗抹法) より多かった。この傾向は 0 日時点で既に現れ、大腸菌が検出できなくなるまで続いた。

培地名	LB			SB		
形態	Agar 培地	液体培地	p 値	Agar 培地	液体培地	p 値
0 日	$2.8 \times 10^5 \pm 3.1$	$1.4 \times 10^7 \pm 0.9$	※	$3.6 \times 10^5 \pm 3.9$	$1.3 \times 10^7 \pm 0.5$	※※
21 日	$3.6 \times 10^2 \pm 2.6$	$4.1 \times 10^4 \pm 4.0$	※	$1.7 \times 10^3 \pm 1.3$	$6.8 \times 10^4 \pm 9.8$	※
42 日	$6.0 \times 10^1 \pm 5.4$	$4.0 \times 10^3 \pm 3.7$	※	$8.0 \times 10^1 \pm 10.5$	$1.9 \times 10^3 \pm 1.3$	※※
63 日	$2.0 \times 10^1 \pm 2.0$	$1.1 \times 10^3 \pm 1.1$	※	$4.0 \times 10^1 \pm 2.0$	$2.6 \times 10^2 \pm 0.5$	※※
84 日	$1.0 \times 10^1 \pm 1.4$	$3.1 \times 10^2 \pm 2.5$	※※	$1.0 \times 10^1 \pm 1.4$	$3.1 \times 10^2 \pm 0.5$	※※
105 日	0	$1.4 \times 10^2 \pm 0.4$	—	0	$1.2 \times 10^2 \pm 0.1$	—

N.S.: 非有意、※:  $p < 0.05$ 、※※:  $p < 0.01$

表 2. R2A agar 培地と LB agar 培地の混釈法による大腸菌検出菌数 (cfu/ml) の比較

試料 (大腸菌標準株) に含まれる菌の検出において、R2A agar 培地と LB agar 培地に検出菌数の差を認めなかった。LB 液体培地では大腸菌を検出できず、試料の適格性が確認された。

培地名	R2A agar 培地	LB agar 培地	LB 液体培地
147 日	5.3 ± 1.7	7.5 ± 4.4	検出限界未満
168 日	2.0 ± 1.2	2.5 ± 1.7	検出限界未満
189 日	0.0	0.8 ± 1.0	検出限界未満

LB 液体培地の検出限界: 20cfu/ml